

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第3425147号

(P3425147)

(45) 発行日 平成15年 7 月 7 日 (2003. 7. 7)

(24) 登録日 平成15年 5 月 2 日 (2003. 5. 2)

(51) Int.Cl.

識別記号

F I

C 0 8 L 5/00

A 6 1 K 47/36

A 6 1 L 27/00

C 0 8 B 37/00

C 0 8 L 1/08

C 0 8 L 5/00

A 6 1 K 47/36

A 6 1 L 27/00

C 0 8 B 37/00

C 0 8 L 1/08

V

Z

請求項の数67(全 13 頁)

(21) 出願番号 特願平5-500263

(86) (22) 出願日 平成4年 5 月 19 日 (1992. 5. 19)

(65) 公表番号 特表平6-508169

(43) 公表日 平成6年 9 月 14 日 (1994. 9. 14)

(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 2 / 0 4 2 1 2

(87) 国際公開番号 W O 9 2 / 0 2 0 3 4 9

(87) 国際公開日 平成4年 11 月 26 日 (1992. 11. 26)

審査請求日 平成10年 7 月 15 日 (1998. 7. 15)

(31) 優先権主張番号 7 0 3 , 2 5 4

(32) 優先日 平成3年 5 月 20 日 (1991. 5. 20)

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(31) 優先権主張番号 8 3 3 , 9 7 3

(32) 優先日 平成4年 2 月 11 日 (1992. 2. 11)

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

前置審査

(73) 特許権者 501475594

ジェンザイム、コーポレーション

GENZYME CORPORATION

アメリカ合衆国マサチューセッツ州、ケンブリッジ、ワン、ケンダル、スクエア  
(番地なし)

(72) 発明者 ミラー、ロバート

アメリカ合衆国マサチューセッツ州、イースト、サンドウィッチ、イースタリー、ロード、24

(74) 代理人 100064285

弁理士 佐藤 一雄 (外1名)

審査官 弘貴 謙二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリアニオン性多糖の非水溶性誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】非水溶性生物適合性組成物の製造方法であって、上記組成物を形成するために十分な条件下においてポリアニオン性多糖、求核剤及び活性化剤を水性混合液中で混合することからなる方法；但し、上記ポリアニオン性多糖はカルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルアミロース、ヒアルロン酸、コンドロイチン-6-硫酸、デルマチン硫酸、ヘパリン及びヘパリン硫酸からなる群より選択され、上記求核剤はアミノ酸アミド、一官能性アミン、アミン酸エステル、アミノアルコール、アミノチオール、アミノフェノール、アミノカテコール、アミノ酸、アミノ酸の塩、ペプチド及びタンパク質からなる群より選択され、及び上記活性化剤はベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、O-ベ

ンゾトリアゾール-1-イル-N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート、プロモトリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、プロモトリス（ピロリジニル）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート及びそれらの対応ハライド塩からなる群より選択される。

【請求項2】2種以上のポリアニオン性多糖が用いられる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】ポリアニオン性多糖がヒアルロン酸である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】ポリアニオン性多糖がカルボキシメチルセルロースである、請求項1に記載の方法。

【請求項5】ポリアニオン性多糖がカルボキシメチルアミロースである、請求項1に記載の方法。

【請求項6】2種のポリアニオン性多糖がヒアルロン酸

及びカルボキシメチルセルロースである、請求項2に記載の方法。

【請求項7】ポリアニオン性多糖が0.0002～0.1Mの濃度で存在する、請求項1に記載の方法。

【請求項8】ポリアニオン性多糖が0.0005～0.02Mの濃度で存在する、請求項7に記載の方法。

【請求項9】方法がpH3.5～8.0で実施される、請求項1に記載の方法。

【請求項10】活性化剤対多糖の化学量論量がモル当量のポリアニオン性多糖当たり少くとも0.1モル当量の活性化剤である、請求項1に記載の方法。

【請求項11】ポリアニオン性多糖対求核剤の化学量論量がモル当量のポリアニオン性多糖当たり少くとも1モル当量の求核剤である、請求項1に記載の方法。

【請求項12】非水溶性生物適合性組成物の製造方法であって、  
上記組成物を形成するために十分な条件下において1種以上のポリアニオン性多糖、改質化合物、求核剤及び活性化剤を水性混合液中で混合し、その場合に上記改質化合物が上記ポリアニオン性多糖において新しい活性カルボニル基の形成を引き起こすことからなる方法；但し、上記ポリアニオン性多糖はカルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルアミロース、ヒアルロン酸、コンドロイチン-6-硫酸、デルマチン硫酸、ヘパリン及びヘパリン硫酸からなる群より選択され、上記改質化合物は1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド、N-ヒドロキシスクシンイミド、4-ニトロフェノール、2-ニトロフェノール、4-ニトロチオフェノール、2-ニトロチオフェノール、ペンタクロロフェノール、ペンタフルオロフェノール、イミダゾール、テトラゾール及び4-ジメチルアミノピリジンからなる群より選択され、上記求核剤はアミノ酸アミド、一官能性アミン、アミノ酸エステル、アミノアルコール、アミノチオール、アミノフェノール、アミノカテコール、アミノ酸、アミノ酸の塩、ペプチド及びタンパク質からなる群より選択され、及び活性化剤はカルボジイミドからなる。

【請求項13】2種以上のポリアニオン性多糖が用いられる、請求項12に記載の方法。

【請求項14】ポリアニオン性多糖がヒアルロン酸である、請求項12に記載の方法。

【請求項15】ポリアニオン性多糖がカルボキシメチルセルロースである、請求項12に記載の方法。

【請求項16】ポリアニオン性多糖がカルボキシメチルアミロースである、請求項12に記載の方法。

【請求項17】2種のポリアニオン性多糖がヒアルロン酸及びカルボキシメチルセルロースである、請求項13に記載の方法。

【請求項18】カルボジイミドが1-エチル-3-(3-

ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド又は1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドメチオジドからなる、請求項12に記載の方法。

【請求項19】ポリアニオン性多糖が0.0002～0.1Mの濃度で存在する、請求項12に記載の方法。

【請求項20】ポリアニオン性多糖が0.0005～0.02Mの濃度で存在する、請求項19に記載の方法。

【請求項21】方法がpH3.5～8.0で実施される、請求項12に記載の方法。

【請求項22】ポリアニオン性多糖対活性化剤の化学量論量がモル当量のポリアニオン性多糖当たり少くとも0.1モル当量の活性化剤である、請求項12に記載の方法。

【請求項23】改質剤対活性化剤の化学量論量がモル当量の活性化剤当たり少くとも1モル当量の改質化合物である、請求項12に記載の方法。

【請求項24】請求項1、2、12又は13の方法に従い製造された非水溶性組成物。

【請求項25】組成物がゲルの形である、請求項24に記載の組成物。

【請求項26】組成物が繊維の形である、請求項24に記載の組成物。

【請求項27】組成物が膜の形である、請求項24に記載の組成物。

【請求項28】組成物がフォームの形である、請求項24に記載の組成物。

【請求項29】組成物が癒着防止組成物の形である、請求項24に記載の組成物。

【請求項30】組成物内に分散された薬学上活性な物質を更に含む、請求項24に記載の組成物。

【請求項31】薬学上活性な物質がタンパク質、成長因子、酵素、薬物、バイオポリマー及び生物学上適合性の合成ポリマーからなる群より選択される、請求項30に記載の組成物。

【請求項32】ポリアニオン性多糖、求核剤及び活性化剤の反応生成物を含む非水溶性組成物；但し、上記ポリアニオン性多糖はカルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルアミロース、ヒアルロン酸、コンドロイチン-6-硫酸、デルマチン硫酸、ヘパリン及びヘパリン硫酸からなる群より選択され、上記求核剤はアミノ酸アミド、一官能性アミン、アミノ酸エステル、アミノアルコール、アミノチオール、アミノフェノール、アミノカテコール、アミノ酸、アミノ酸の塩、ペプチド及びタンパク質からなる群より選択され、及び上記活性化剤はベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、O-ベンゾトリアゾール-1-イル-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート、プロモトリリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、プロモトリリス（ピロリジニル）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート及びそれらの対応ハライ

ド塩からなる群より選択される。

【請求項 3 3】2 種以上のポリアニオン性多糖、求核剤及び活性化剤の反応生成物を含む非水溶性組成物；但し、上記ポリアニオン性多糖はカルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルアミロース、ヒアルロン酸、コンドロイチン-6-硫酸、デルマチン硫酸、ヘパリン及びヘパリン硫酸からなる群より選択され、上記求核剤はアミノ酸アミド、一官能性アミン、アミノ酸エステル、アミノアルコール、アミノチオール、アミノフェノール、アミノカテコール、アミノ酸、アミノ酸の塩、ペプチド及びタンパク質からなる群より選択され、及び上記活性化剤はベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、O-ベンゾトリアゾール-1-イル-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート、プロモトリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、プロモトリス（ピロリジニル）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート及びそれらの対応ハライド塩からなる群より選択される。

【請求項 3 4】ポリアニオン性多糖、改質化合物、求核剤及び活性化剤の反応生成物を含む非水溶性組成物；但し、上記ポリアニオン性多糖はカルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルアミロース、ヒアルロン酸、コンドロイチン-6-硫酸、デルマチン硫酸、ヘパリン及びヘパリン硫酸からなる群より選択され、上記改質化合物は1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール-水和物、N-ヒドロキシルホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、N-ヒドロキシルホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、4-ニトロフェノール、2-ニトロフェノール、4-ニトロチオフェノール、2-ニトロチオフェノール、ペンタクロロフェノール、ペンタフルオロフェノール、イミダゾール、テトラゾール及び4-ジメチルアミノピリジンからなる群より選択され、上記求核剤はアミノ酸アミド、一官能性アミン、アミノ酸エステル、アミノアルコール、アミノチオール、アミノフェノール、アミノカテコール、アミノ酸、アミノ酸の塩、ペプチド及びタンパク質からなる群より選択され、及び上記活性化剤はカルボジイミドからなる。

【請求項 3 5】2 種以上のポリアニオン性多糖、改質化合物、求核剤及び活性化剤の反応生成物を含む非水溶性組成物；但し、上記ポリアニオン性多糖はカルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルアミロース、ヒアルロン酸、コンドロイチン-6-硫酸、デルマチン硫酸、ヘパリン及びヘパリン硫酸からなる群より選択され、上記改質化合物は1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール-水和物、N-ヒドロキシルホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、N-ヒドロキシルホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、4-ニトロフェノール、2-ニトロフェノール、4-ニトロチオフェノール、2-ニトロチオフェノール、ペンタクロロフェノール、ペンタフルオロフェノール、イミダゾール、テトラゾール及び4-ジメチルアミノピリジンからなる群より選択され、上記求核剤はアミノ酸アミド、一官能性アミン、アミノ酸エステル、アミノアルコール、アミノチオール、アミノフェノール、アミノカテコール、アミノ酸、アミノ酸の塩、ペプチド及びタンパク質からなる群より選択され、及び上記活性化剤はカルボジイミドからなる。

ノール、イミダゾール、テトラゾール及び4-ジメチルアミノピリジンからなる群より選択され、上記求核剤はアミノ酸アミド、一官能性アミン、アミノ酸エステル、アミノアルコール、アミノチオール、アミノフェノール、アミノカテコール、アミノ酸、アミノ酸の塩、ペプチド及びタンパク質からなる群より選択され、及び上記活性化剤はカルボジイミドからなる。

【請求項 3 6】ポリアニオン性多糖がヒアルロン酸である、請求項32又は34に記載の組成物。

【請求項 3 7】ポリアニオン性多糖がカルボキシメチルセルロースである、請求項32又は34に記載の組成物。

【請求項 3 8】ポリアニオン性多糖がカルボキシメチルアミロースである、請求項32又は34に記載の組成物。

【請求項 3 9】2 種のポリアニオン性多糖がヒアルロン酸及びカルボキシメチルセルロースである、請求項33又は35に記載の組成物。

【請求項 4 0】カルボジイミドが1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド又は1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドメチオジドからなる、請求項35に記載の組成物。

【請求項 4 1】組成物がゲルの形である、請求項32、33、34又は35に記載の組成物。

【請求項 4 2】組成物が繊維の形である、請求項32、33、34又は35に記載の組成物。

【請求項 4 3】組成物が膜の形である、請求項32、33、34又は35に記載の組成物。

【請求項 4 4】組成物がフォームの形である、請求項32、33、34又は35に記載の組成物。

【請求項 4 5】組成物が癒着防止組成物の形である、請求項32、33、34又は35に記載の組成物。

【請求項 4 6】組成物内に分散された薬学上活性な物質を更に含む、請求項32、33、34又は35に記載の組成物。

【請求項 4 7】薬学上活性な物質がタンパク質、成長因子、酵素、薬物、バイオポリマー及び生物学上適合性の合成ポリマーからなる群より選択される、請求項46に記載の組成物。

【請求項 4 8】非水溶性生物適合性組成物の製造方法であって、

上記組成物を形成するために十分な条件下においてポリアニオン性多糖及び活性化剤を水性溶液中で混合することからなる方法；但し、上記ポリアニオン性多糖はカルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルアミロース、ヒアルロン酸、コンドロイチン-6-硫酸、デルマチン硫酸、ヘパリン及びヘパリン硫酸からなる群より選択され、及び上記活性化剤はベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、O-ベンゾトリアゾール-1-イル-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート、プロモトリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、プロモ

トリス（ピロリジニル）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート及びそれらの対応ハライド塩からなる群より選択される。

【請求項49】ポリアニオン性多糖がヒアルロン酸である、請求項48に記載の方法。

【請求項50】ポリアニオン性多糖がカルボキシメチルセルロースである、請求項48に記載の方法。

【請求項51】非水溶性生物適合性組成物の製造方法であって、

上記組成物を形成するために十分な条件下においてポリアニオン性多糖及び活性化剤を水性溶液中で混合することからなる方法；但し、ポリアニオン性多糖はカルボキシメチルアミロースであり、上記活性化剤はカルボジイミドからなる。

【請求項52】カルボジイミドが1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド又は1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドメチオジドからなる、請求項51に記載の方法。

【請求項53】ポリアニオン性多糖が0.005~0.1Mの濃度で存在する、請求項48に記載の方法。

【請求項54】ポリアニオン性多糖が0.01~0.02Mの濃度で存在する、請求項53に記載の方法。

【請求項55】方法がpH3.5~8.0で実施される、請求項48に記載の方法。

【請求項56】ポリアニオン性多糖対活性化剤のモル比が少なくとも1:1である、請求項48に記載の方法。

【請求項57】ポリアニオン性多糖対活性化剤のモル比が約4:1である、請求項48に記載の方法。

【請求項58】請求項1の方法に従い製造された非水溶性組成物。

【請求項59】組成物がゲルの形である、請求項58に記載の組成物。

【請求項60】組成物が繊維の形である、請求項58に記載の組成物。

【請求項61】カルボキシメチルアミロース及び活性化剤の反応生成物を含む非水溶性組成物；但し、上記活性化剤はカルボジイミドからなる。

【請求項62】カルボジイミドが1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド又は1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドメチオジドからなる、請求項61に記載の組成物。

【請求項63】ゲル内に分散された薬学上活性な物質を更に含む、請求項61に記載の組成物。

【請求項64】薬学上活性な物質がタンパク質、成長因子、酵素、薬物、バイオポリマー及び生物学上適合性の合成ポリマーからなる群より選択される、請求項63に記載の組成物。

【請求項65】組成物が癒着防止組成物の形である、請求項61に記載の組成物。

【請求項66】組成物が膜の形である、請求項61に記載

の組成物。

【請求項67】組成物がフォームの形である、請求項61に記載の組成物。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 発明の背景

本発明は化学的に改質されたポリアニオン性多糖から形成された生物適合性フィルム及びゲルに関する。

ヒアルロン酸（“HA”）は例えば滑液、硝子体液、血管壁及び臍帯と他の結合組織で見られる天然ムコ多糖である。多糖は交互の $\beta$  1-3 グルクロニジン酸及び $\beta$  1-4 グルコサミニジン酸結合により連結された交互のN-アセチル-D-グルコサミン及びD-グルクロン酸残基からなり、その結果反復単位は $-(1 \rightarrow 4) - \beta - D - GlcA - (1 \rightarrow 3) - \beta - D - GlcNAc -$ である。水中でヒアルロン酸は溶解して、高粘稠液を形成する。天然源から単離されたヒアルロン酸の分子量は通常 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ ドルトンの範囲内である。

ここで用いられるような“HA”という用語はヒアルロン酸と例えばヒアルロン酸ナトリウム（ナトリウム塩）、ヒアルロン酸カリウム、ヒアルロン酸マグネシウム及びヒアルロン酸カルシウムを含めたそのヒアルロン酸塩のいずれかを意味する。

化学的に改質された（“誘導された”）形のHAは術後期間中に体組織の癒着又は付着を防止するために外科補助品として有用である。誘導HAゲル又はフィルムは相互癒着を妨ぐために分離したままにされる組織間の箇所へ注入又は挿入される。有効であるためには、ゲルはそのゲルが最後に分散して組織が接触したときにそれらがおもや癒着する傾向を有しないほど十分に長い期間にわたり適所に留まって組織接触を妨げなければならない。

化学的に改質されたHAは制御放出薬物デリバリーにとっても有用である。Balazsら、1986の米国特許第4,582,865号明細書では“HAの架橋ゲルはそこに分散されているが但しゲル高分子マトリックスに共有結合されていない低分子量物質の放出を遅らせることができる”と述べている。T. J. Rosemanら、Controlled Release Delivery Systems（制御放出デリバリー系）、Marcel Dekker, Inc., New YorkにおけるR. V. Sparetら、1983, Chapter 6, pages 107-119では直接的に又は中間連結基としてアラニン架橋を含むエステル複合体のいずれかでエステル結合鎖によりヒアルロン酸と共有結合されたクロラムフェニコールの徐放性について記載している。

I. Danishefskyら、1971, Carbohydrate Res., Vol. 16, pages 199-205では水溶液中1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩（“EDC”）の存在下においてムコ多糖をアミノ酸エステルと反応させることでムコ多糖のカルボキシル基を置換アミドに変換することによるムコ多糖の改質について記載している。彼らはグリシメチルエステルをHAを含めた様々な多糖と反応させた。得られた生成物は水溶性であり、即

ちそれらは水又は体組織間で出会うような水性環境中で急速に分散する。

HA組成物を非水溶性にする提案としてはHAの架橋がある。T. J. Rosemanら, Controlled Release Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New YorkにおけるR. V. Sparerら, 1983, Chapter 6, pages 107-119ではシステイン残基をアミド結合でHAに付加することによりHAを改質し、しかる後付加されたシステイン残基間でジスルフィド結合を形成させることによりシステイン改質HAを架橋することについて記載している。システイン改質HAはそれ自体水溶性だが、ジスルフィド形への酸化による架橋のみで非水溶性になった。

De BellderらのPCT公開第W0 86/00912号明細書ではカルボキシル含有多糖を二又は多官能性エポキシドで架橋することにより製造された術後組織癒着防止用の徐分解性ゲルについて記載している。低水溶性を有するHAの架橋ゲルを製造する上で提案された他の反応性二又は多官能性試薬としては50℃でアルカリ性媒体中1, 2, 3, 4-ジエポキシブタン (T. C. Laurentら, 1964, Acta Chem. Scand, Vol. 18, page 274) ; アルカリ性媒体中ジビニルスルホン (E. A. Balaszら, 米国特許第4, 582, 865号 (1986)) ; ホルムアルデヒド、ジメチロール尿素、ジメチロールエチレン尿素、エチレンオキシド、ポリアジリジン及びポリイソシアネートを含めた様々な他の試薬 (E. A. Balaszら, 英国特許出願第8420560号 (1984)) がある。T. Malsonら, 1986, PCT公開第W0 86/00079号明細書ではHAを二又は多官能性エポキシドのような二又は多官能性架橋試薬と反応させることにより硝子体液代用品向けのHAの架橋ゲルを製造することについて記載している。T. Malsonら, 1986, EPO第0193510号明細書では架橋HAゲルを真空乾燥又は圧縮することによる成形品の製造について記載している。

#### 発明の要旨

一面において、本発明は非水溶性生物適合性組成物の製造方法の特徴とするが、その方法では組成物を形成するために十分な条件下で水性混合液中においてポリアニオン性多糖、活性化剤及び求核剤を混合する。

本発明のこの面の好ましい態様において、用いられる活性化剤としてはベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス (ジメチルアミノ) ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、O-ベンゾトリアゾール-1-イル-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート、プロモトリス (ジメチルアミノ) ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート又はそれらの対応ハライド塩がある。

反応液中におけるポリアニオン性多糖の好ましい濃度は0.0002~0.1M、更に好ましくは0.0005~0.02Mである。反応を実施する上で好ましいpHは3.5~8.0である。好ましい試薬化学量論量はモル当量のポリアニオン性多糖当たり少くとも0.1モル当量の活性化剤である。

本発明のもう一つの面は非水溶性生物適合性組成物の製造方法の特徴とするが、その方法では組成物を形成するために十分な条件下で水性混合液中においてポリアニオン性多糖、活性化剤、改質化合物及び求核剤を混合する。

本発明のこの面の好ましい態様において、改質化合物としては1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール-水和物、N-ヒドロキシルホスクシンイミド、N-ヒドロキシルスクシンイミド、4-ニトロフェノール、2-ニトロフェノール、4-ニトロチオフェノール、2-ニトロチオフェノール、ペンタクロロフェノール、ペンタフルオロフェノール、イミダゾール、テトラゾール、4-ジメチルアミノピリジン又は他の関連化合物がある。活性化剤は好ましくはジイミド、更に好ましくはカルボジイミド、例えば1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド及び1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドメチオジドである。

更に本発明の第二面の好ましい態様において、好ましいポリアニオン性多糖は0.0002~0.1M、更に好ましくは0.005~0.02Mの濃度で反応液中に存在する。反応を実施する上で好ましいpHは3.5~8.0である。好ましい試薬化学量論量はモル当量のポリアニオン性多糖当たり少くとも1.0モル当量の活性化剤及びモル当量の活性化剤当たり少くとも1モル当量の改質化合物である。本発明の方法で使用上好ましいポリアニオン性多糖としてはヒアルロン酸 (HA)、カルボキシメチルセルロース (CMC)、カルボキシメチルアミロース (CMA)、コンドロイチン-6-硫酸、デルマチン硫酸、ヘパリン及びヘパリン硫酸がある; HA、CMC及びCMAが特に好ましい。2種以上のポリアニオン性多糖も本発明の方法で用いてよいこともよく理解される。

更に本発明の双方の面において、活性化されたポリアニオン性多糖と反応することができる好ましい求核化合物としては、1つの富電子部分のみが求核剤として活性化ポリアニオン性多糖と反応するアミノ酸アミド (好ましくは、塩酸ロイシンアミド)、一官能性アミン (好ましくは、3-アミノ-1-プロパノール)、アミノ酸エステル (好ましくは、メチルエステル又はt-ブチルエステルを含めたブチルエステル)、アミノアルコール、アミノチオール、アミノフェノール、アミノカテコール、アミノ酸、アミノ酸の塩、ペプチド、タンパク質及び他の複合 (ambident) 求核性化合物がある。

更にもう1つの面において、本発明は組成物を形成するために十分な条件下でポリアニオン性多糖及び活性化剤を混合することによる非水溶性組成物の製造方法の特徴とする。

本発明のこの面による好ましいポリアニオン性多糖としてはヒアルロン酸 (HA)、カルボキシメチルセルロース (CMC)、カルボキシメチルアミロース (CMA)、コン

ドロイチン-6-硫酸、デルマチン硫酸、ヘパリン及びヘパリン硫酸がある；HA、CMC及びCMAが特に好ましい。

反応を実施する上で好ましいpHは3.5~8.0、更に好ましくは4.0~5.1、最も好ましくは4.7~5.1である。多糖に関して好ましい濃度は0.005~0.1M、更に好ましくは0.01~0.02Mである。多糖対活性化剤のモル比は好ましくは少くとも1:1、更に好ましくは約1:4である。好ましい活性化剤はカルボジイミド、例えば1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド及び1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドメチオジドである。

ここで用いられる“水性混合液”という用語は主に水から構成される溶液に通常関するが、但し極性非プロトン溶媒も1/20倍ほどで含んでよい。好ましい非プロトン溶媒としてはアセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ヘキサメチルホスホルアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリジノン、1,4-ジオキサン及びアセトンがある。

“ポリアニオン性多糖”は約pH4.0以上のpH値で2以上の負電荷基、例えばカルボキシル基を有する多糖である。

ここで用いられるポリアニオン性多糖の“モル又はモル濃度(M)”という用語はポリマー内に含まれる反復モノマー単位のモルに関する。

ポリアニオン性多糖はポリアニオン性多糖におけるカルボキシル基が求核攻撃されやすくするように水性混合液中で処理された場合に、その用語がここで用いられるように、“活性化”されると言われる；“活性化剤”とはポリアニオン性多糖を含有する水性混合液中でポリアニオン性多糖をそのように活性化させる物質である。

“改質化合物”は活性化ポリアニオン性多糖の存在下でポリアニオン性多糖の活性化カルボキシル部分と反応して求核剤と反応しうる新しい活性化種を形成する試薬として定義される。

本発明の方法で生産された非水溶性組成物を形成する活性化ポリアニオン性多糖はゲルの形でも又は繊維の形であってもよい。ブレンドも2種以上の異なる活性化ポリアニオン性多糖を様々な量でミックスすることにより製造してよい。好ましくは、ブレンドは活性化HA及び活性化CMC又は活性化HA及び活性化CMAからなる。

本発明の組成物及びブレンドは癒着防止組成物の形、例えばフィルム、フォーム又はシリンジ内部込みに適した組成物の形で提供してよい。それらは全体的に分散された薬学上活性な物質も含有してよく、それらを薬物デリバリー系として有用なものにする。適切な物質としてはタンパク質、成長因子、酵素、薬物、バイオポリマー及び生物学上適合性の合成ポリマーがある。

ここで用いられる“フィルム”という用語はゲルもしくは繊維を圧縮するか又はゲルもしくは繊維を脱水させることで形成された物質を意味する。本発明のいかなる

ゲル又は繊維もこのようなフィルムに形成してよい。

ここで用いられる“フォーム”という用語はガスバブルを本発明のゲル又は繊維中に導入することで形成された物質を意味する。

“生物適合性”物質とは、その用語がここで用いられているように、生物学的機能に関して医学上許容されない毒性又は有害作用を有しない物質である。

我々はポリアニオン性多糖を適切な活性化剤で処理することにより生産されたゲル、フォーム又はフィルムがいずれも別に加えられる二又は多機能性架橋剤の使用なしに低い水溶性を有することを発見した。

“水溶性”ゲル又はフィルムとは、その用語がここで用いられているように、水中1%重量/重量(“w/w”)ヒアルロン酸ナトリウムの水溶液を乾燥させることで形成されたもので、3cm×3cm×0.3mmの寸法を有するものであり、20℃の蒸留水50mlのビーカー中において攪拌せずに放置させたとき3分間後にフィルムとしてその構造一体性を失い、20分間以内で全体的に分散されるようになるものである。ポリアニオン性多糖の1%水溶液を用いて形成され、本発明に従い改質された同寸法を有する本発明の“非水溶性”フィルムは、その語句及び類似用語がここで用いられるように、同様に20℃で蒸留水50mlのビーカー中攪拌せずに放置されたとき20分間後も構造的にそのままである；フィルム境界及び端部は24時間後もなお存在するが、フィルムは膨潤している。

ゲル及びフィルムは非水溶性であるため、それらは未反応物質を除去するため使用前に水で十分に洗浄することができる。

本発明のゲル、フォーム及びフィルムは反応混合液中に色素又は染料を含有させることで着色に製造してもよい。このような着色フィルム及びゲルは適所にあるとき又は配置中にもっと容易にみることができ、無色物よりも容易に外科処置中取扱えるようになる。

本発明のフィルム、ゲル及びフォームは水和時であってもそれらの強度を留める。それらは縫合の必要性なしに生物組織に付着するため、それらは術後癒着防止膜として有用である。それらは出血の存在下でも組織に適用できる。

本発明の他の特徴及び利点はその好ましい態様の下記説明と請求の範囲から明らかになる。

好ましい態様の説明

リジン改質HA

本発明のゲル、フォーム及びフィルムは通常下記のようにして製造される。HAが水に溶解され、得られた水性混合液のpHが下方に調整される；次いで溶解したHAが適切な活性化剤を混合することで活性化され、適切なリジンエステルが活性化HAと混合され、望ましいゲルが生成するまで放置せしめられる。活性化剤及びエステルはいかなる順序で混合してもよい。

本発明のリジン改質ゲル及びフィルムの好ましい製造

方法は更に詳細に記載される。当業者であれば認識するように、本発明のゲル及びフィルムは本発明の方法に属しているがここで記載されたものとは詳細な点で異なるプロトコルを用いて製造できる。

ヒアルロン酸又はヒアルロン酸ナトリウムのようなヒアルロン酸の塩のサンプルが水性混合液を得るため水に溶解される。様々な起源のうちいずれからのHAも使用できる。周知のように、HAは動物組織から抽出しても又は細菌醗酵の産物として集めてもよい。ヒアルロン酸は例えばPCT公開第W0 86/04355号明細書で記載されるようにバイオプロセス技術により商業的な量で産生することができる。好ましくは、この第一水性混合液中におけるHAの濃度は0.4~2.5%重量/重量（“w/w”）の範囲内である。その後の反応はそれより有意に低い濃度だと遅くて有効性が低く、一方それより有意に高い濃度ではそれらの高粘度のせいで取扱いが困難である。

水性HA混合液は酸性、好ましくは4.0~5.0、更に好ましくは4.3~4.75のpHを有しているべきである。それより低いpH値では好ましい活性化剤EDCが不安定であり、それより高い値では反応速度が減少する。好ましくは塩酸がpHを調整するために加えられるが、他の公知の酸も使用できる。

水性HA混合液のpHが調整されると、活性化剤が混合される。好ましい活性化剤としてはカルボジイミド、最も好ましくはEDC（一部の参考文献においてこの物質は1-（3-ジメチルアミノプロピル）-3-エチルカルボジイミド又は“DEC”と称される）又はETC（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドメチオジド）がある。

次いで求核性リジンエステルが水性HA-活性化剤混合液に混合される。好ましいエステルとしてはメチル、エチル又はt-ブチルエステルがある。リジンはジリジン、トリリジン、ポリリジン又はそれらの塩酸塩の形であってもよい。

リジンエステル及び活性化剤はすべて一度に又は徐々にいずれかでpH調整HA混合液にいかなる順序で混合してもよい。

着色製品が望まれるならば、サーバ（Serva）により“サーバ・ブルー”として配布される“クマシー（Coomassie™）ブリリアントブルーR-250”としても知られる青色色素“ブリリアントブルーR”のような色素又は染料の溶液がこの時点で反応混合液に混合できる。得られた製品は体組織の色と良い対照をなす青色を有し、手術時に取扱われるとき及び適所にあるときにフィルム又はゲルをみやすくさせる。

試薬（もしあるならば染料又は色素も）が混合されると、反応混合液は単純にしばらく放置されるか、あるいはそれは連続的に又は時々攪拌又はかきまぜられる。

試薬の混合時にpHは上昇するが、反応が進行しても酸の添加で望ましいpHに維持できる。しかしながら、我々

は様々な望ましい物理的性質を有するフィルム及びゲルが反応の進行に従い単純にpHを上昇させることで得られることを発見した。試薬、特にEDC及びリジンエステルの添加様式は重要でないが、但しこれらの試薬対HAの比率は重要である。我々はHA:EDC:リジンエステルの比率が1:2:1~1:4:10の範囲である場合に最良の結果が得られることを発見した。それより低い値だと典型的にはより弱くてより不溶性でない製品を生じ、一方それより高い値だと典型的にはより強くより不溶性の製品を生じる。

#### ポリアニオン性多糖改質HA

ポリアニオン性多糖-改質HAゲル及びフィルムは非水溶性沈澱物を形成するために（前記のような）HAをポリアニオン性多糖及び活性化剤とミックスすることにより通常製造される。その沈澱物は術後癒着防止に有用な薄膜に流延することができる。それは前記のように着色してもよい。沈澱物からのフィルム流延物の強度を増加させるために、そのフィルムはそれらが約105°Cで24時間真空下（約30mmHg）で加熱される脱水熱処理に付してもよい。

多糖及びHAは一緒にミックスでき、その後で活性化剤が加えられる。一方、多糖は活性化剤と反応させ、しかる後HAが加えられてもよい。第三のオプションはHAを活性化剤と混合し、しかる後多糖を加えることである。好ましい活性化剤は前記のとおりであり、カルボジイミドEDC及びETCがある。反応はpH4~5で実施されることが好ましい。好ましい多糖濃度は0.005~0.1Mの範囲であり、更に好ましくは0.01~0.02Mの範囲である。多糖対活性化剤の好ましいモル比は少くとも1:1、更に好ましくは約1:4である。

#### 活性化ポリアニオン性多糖

ポリアニオン性多糖ゲル、フィルム及びフォームは非水溶性物質を形成するために少くとも1種のポリアニオン性多糖（例えばHA、CMC、CMA）を活性化剤とミックスすることにより通常製造される。好ましい活性化剤としてはカルボジイミド、EDC及びETCがある。反応は3.5~8のpHで実施され、最適の反応条件はpH4.7~5.1である。反応で用いられる多糖分子量は $9.0 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^6$ ドルトンの範囲であり、好ましくは $2.5 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ ドルトンである。多糖対活性化剤の好ましいモル比は少くとも1:1、更に好ましくは約1:4である。この方法で形成された不溶性物質はゲルの形で又は繊維の形でよく、癒着防止又は薬物デリバリー向けに直接用いてもあるいは薄いフィルム又はフォームを得るため平型に流延して風乾又は凍結乾燥してもよい。

加えて、ブレンドは異なる未精製又は精製された活性化ポリアニオン性多糖を様々な量でミックスすることにより製造できる。これらのブレンドはオーバーヘッドスターラー及び/又は高剪断ミキサーでミックスすることにより均一に得られる。未反応活性化剤は使用前に標準

方法に従い分子量サイジング、透析、透析濾過又は水溶性溶媒での分別沈澱により未精製混合物から除去してよい。精製混合物は癒着防止及び／又は薬物デリバリー向けに直接用いてもよくあるいはフィルム又はフォームを形成するため平型に流延して風乾又は凍結乾燥してもよい。

#### Bop試薬活性化ポリアニオン性多糖

ポリアニオン性多糖非水溶性ゲル、フィルム及びフォームは望ましい不溶性組成物を形成するために少なくとも1種のポリアニオン性多糖（例えばHA、CMC、CMA）を水性混合液に溶解し、ポリアニオン性多糖をベンソトリアゾール-1-イルオキシトリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（Bop試薬）のような活性化剤で活性化させ、活性化されたポリアニオン性多糖を適切な求核剤と反応させることによっても通常製造される。

反応は3.5～8のpHで実施され、最適の反応条件はpH 4.6～5.0である。反応で用いられるポリアニオン性多糖の分子量は $6.0 \times 10^2 \sim 4 \times 10^6$ ダルトンの範囲であり、好ましくは $5 \times 10^5$ ダルトン以上である。好ましい試薬化学量論量はモル当量のポリアニオン性多糖当たり少くとも0.1モル当量の活性化剤及びモル当量のポリアニオン性多糖当たり少くとも1モル当量の求核剤である。

ポリアニオン性多糖のBOP活性化の1つの大きな予想外の利点はポリアニオン性多糖の分子量が求核剤とのカップリングで減少しないことである。この結果はカルボジイミド単独を要する反応とは対照的であり、その反応では我々に求核剤カップリングでHA分子量の減少について観察している。

本発明の不明確な面は有機溶媒中のみで使用のために前記された有機可溶性活性化剤が水性環境中で求核剤と水溶性ポリアニオン性多糖との化学的カップリングを起こせることである。この観察はいかなる未反応活性化剤も反応溶液をいずれか適切な非水混和性有機溶媒で抽出することにより簡単に非水溶性生成物から除去できるという点でかなり予想外の追加利点を与える。このような溶媒の例としてはジエチルエーテル、塩化メチレン、クロロホルム、酢酸エチル又はテトラヒドロフランがある。

#### 改質カルボジイミド活性化ポリアニオン性多糖

ポリアニオン性多糖非水溶性ゲル、フィルム及びフォームは望ましい不溶性組成物を形成するために少なくとも1種のポリアニオン性多糖（例えばHA、CMC、CMA）を水性混合液に溶解し、ポリアニオン性多糖をジイミド、例えばEDC又はETCのような活性化剤で活性化させ、活性化されたポリアニオン性多糖を1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物（HOBt）、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物又は他の前記化合物の1つのような改質化合物で改質し、活性化ポリアニオン性多糖を適切な求核剤と反応させることにより通常製造される。

反応で用いられるポリアニオン性多糖の分子量範囲は $6.0 \times 10^2 \sim 4.0 \times 10^6$ ダルトンであり、好ましくは $5.0 \times 10^5$ ダルトン以上である。好ましい試薬化学量論量はモル当量のポリアニオン性多糖当たり少くとも0.1モル当量の活性化化合物であり、更に好ましくは少くとも1:1である。更に、好ましい試薬化学量論量はモル当量の活性化剤当たり少くとも1モル当量の改質化合物を包含する。活性化剤との反応は3.5～8のpHで実施され、最適の反応条件は4.0～4.8である。改質化合物によるポリアニオン性多糖の改質は3.0～8.0のpHで実施され、最適の改質条件はpH 3.3～4.5である。

用いられる活性化剤がジイミドであるケースにおいて、改質化合物は中間体O-アシルイソ尿素と反応して、求核剤に転位される新しい活性カルボニル基を形成する。

水に低い溶解性を示す有機可溶性改質試薬が水性混合液中で求核剤へのポリアニオン性多糖のカップリングを行えることは我々の発見である。改質剤とポリアニオン性多糖とのこの溶解度差のかなり予想外の利点は不溶性生成物がクロロホルム、塩化メチレン、酢酸エチルもしくはジエチルエーテルのような適切な非水混和性有機溶媒での抽出又はアルコール沈澱及び摩砕により精製できることである。

改質された活性化ポリアニオン性多糖への求核剤のカップリングにより付与される予想外の追加利点は、反応が複合求核性化合物（例えば、アミノアルコール、アミノ酸、アミノチオール、アミノフェノール、アミノカテコール、ペプチド及びタンパク質）との反応で特異性をコントロールしうる酸性条件下で実施でき、その結果潜在的にいくつかの富電子部分のうち1つのみが求核剤として活性化ポリアニオン性多糖と反応できることである。

#### フィルム及びゲル

前記に従い改質されたポリアニオン性多糖は直接的にフィルムとして流延できる。典型的には、反応混合液は望ましいサイズ及び形状を有する容器に注がれ、風乾される。一般に、厚く注入された混合液を乾燥することで形成されたフィルムは、それらは低い表面積/容量を有するのであるが、薄くて高い表面積/容量混合液を乾燥することで形成されたフィルムよりも大きな強度を有する。

一方、フィルムは例えばEP0第0193510号明細書で記載されたように、例えば少くとも一方が多孔質である2表面間でゲルを圧縮するような水を逃がす条件下でゲルを圧縮することにより形成できる。

所望であれば、ゲル又はフィルムは例えば水又は1M水性塩化ナトリウムでの灌流により使用前に洗浄することができる。一方、反応混合液はフィルムとして流延する前に残留試薬を除去するために透析できる。残留試薬又は置換尿素類のような試薬由来物質を除去するための洗



浄はフィルム又はゲルが治療適用向けに用いられるならば望ましい。前記のようにブリリアントブルーRで青に着色されたゲル又はフィルムはこのような洗浄時にそれらの着色は失わない。試薬又は反応生成物の除去は高圧液体クロマトグラフィーでモニターできる。

#### 発明の具体的な説明

本発明は下記例で更に詳細に記載される。これらの例は説明のために示され、請求の範囲で記載されたことを除き本発明を制限するためではない。なお、以下の例1～例22は参考例である。

例1: この例において、ヒドロゲルは活性化剤としてBDC及び求核剤としてロイシンメチルエステル塩酸塩を用いて製造した。

$1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$  の分子量を有するヒアルロン酸ナトリウム (400mg; 1.0mmol のカルボキシル基) を蒸留水 10ml に溶解した。水溶液の pH を 0.1N HCl の添加で pH 4.75 に調整した。次いで EDC 314mg (1.64mmol) をすべて一度に加え、しかる後 L-ロイシンメチルエステル塩酸塩 190mg (1.05mmol) を加えた。その後に反応混合液の pH は 2 時間で 6.2 まで上昇した。反応混合液を室温で 5 時間保ったところ、それは濃厚な不溶性ヒドロゲルを形成した。このヒドロゲルはその物理的性質の喪失なしに残留試薬を除去するため 1M NaCl 溶液で洗浄できた。

例2: この例では様々な EDC/ロイシン:HA 比率をゲル形成及び性質の比較のために用いた。

操作は例 1 のとおりであるが、水 15ml 中でヒアルロン酸ナトリウム (400mg; 1.0mmol のカルボキシル基) を用いた。次いで別の実験として、下記量の EDC 及びロイシンメチルエステル塩酸塩を加えた: EDC 153mg (0.8mmol) / ロイシンメチルエステル塩酸塩 182mg (1.0mmol); EDC 76mg (0.4mmol) / ロイシンメチルエステル塩酸塩 90mg (0.5mmol); EDC 38mg (0.2mmol) / ロイシンメチルエステル塩酸塩 45mg (0.25mmol)。強いヒドロゲルは最高比率の EDC 及びロイシンメチルエステル塩酸塩のときに例 1 のようにして得られた。最低比率の反応剤 (0.2mmol / 0.25~1.0mmol HA カルボキシル基) のときには弱いゲルを得たが、これは 2 週間後に液体に崩壊した。

例3: この例では HA 濃度を得られたゲル性質の比較のために半分に減少させた。

操作は例 1 のとおりであるが、但し HA (400mg; 1.0mmol のカルボキシル基) を水 15ml ではなく 30ml に溶解した (HA 1-1/3% w/w)。ヒドロゲルを形成させたが、それは例 1 で得られた場合よりも弱かった。

例4: この例においてフィルムは活性化剤として EDC 及び求核剤としてロイシンメチルエステル塩酸塩を用いて製造した。

ヒアルロン酸ナトリウム (400mg; 1.0mmol のカルボキシル基) を蒸留水 40ml に溶解した。溶液の pH を 0.1N HCl の添加で pH 4.75 に調整した。次いで EDC (314mg; 1.64mmol) を一度に加え、しかる後 L-ロイシンメチルエス

テル塩酸塩 190mg (1.05mmol) を加えた。反応混合液の pH は 2 時間で 6.2 に上昇したが、その後で溶液を面積 6360mm<sup>2</sup> のペトリ皿に注ぎ、2 日間かけてフィルムになるまで乾燥させた。こうして生産されたフィルムは強く、水及び 1M 水性 NaCl に不溶性であった。そのフィルムはそれらの物理的性質の喪失なしに残留試薬を除去するため例 1 のように水又は水性 NaCl で洗浄できた。このようなフィルムの赤外線分光分析では約 2130cm<sup>-1</sup> でカルボジイミド吸収を示さず、約 1740cm<sup>-1</sup>、1700cm<sup>-1</sup>、1650cm<sup>-1</sup> 及び 1550cm<sup>-1</sup> で吸収を示した。

例5: この例では様々な HA 濃度を得られたフィルム性質の比較のためにフィルム製造に際して用いた。

例 4 で記載された操作を繰り返したが、但し HA (400mg; 1.0mmol のカルボキシル基) を蒸留水 30ml、40ml 又は 100ml に溶解することで得られた 3 つの異なる初期 HA 濃度を用いた。これら各初期濃度の HA を用いて生産されたフィルムは強く、水及び 1M 水性 NaCl に不溶性であり、一例濃度範囲の HA が使用できることを示した。これらフィルムの各々ははその物理的性質の喪失なしに水又は水性 NaCl で洗浄できた。

例6: この例は、フィルムを形成した後でそれを洗浄した場合と比較されるように、フィルムを形成するため流延する前に反応混合液を透析した効果について示す。

ヒアルロン酸ナトリウム (水 40ml 中 400mg)、EDC (314mg; 1.64mmol)、及び L-ロイシンメチルエステル塩酸塩 (190mg; 1.05mmol) を例 4 のように反応させた。反応 (2 時間) の終了後、反応混合液は残留試薬を除去するため 12,000NMW カットオフ透析管で水に対して透析した。次いで透析混合液を例 4 のようにフィルムとして流延した。こうして得られたフィルムは強く、水及び 1M 水性 NaCl に不溶性であった。

例7: この例においてフィルムは異なる表面積/容量で混合液を乾燥して生産されたフィルムの性質を比較するためにもっと厚く注入された反応混合液を乾燥させることにより形成した。

例 4 のようにして得られた反応混合液 (反応液容量 40ml) を小さなペトリ皿 (面積 3330mm<sup>2</sup>) に流延した。こうして得られたフィルムは 1M 水性 NaCl 及び水 (100°C; 1 時間) に不溶性であった。

例8: この例においてフィルムは他のアミノ酸エステル及び EDC で活性化された HA を用いて製造した。

HA (H<sub>2</sub>O 40ml 中 400mg) の溶液を 0.1N HCl で pH 4.7 にした。次いで EDC (314mg; 1.6mmol) をすべて一度に加え、しかる後 1mmol のアミノ酸誘導体を加えた。反応混合液をペトリ皿に注ぎ、乾燥させた。不溶性フィルムは L-バリンメチルエステル塩酸塩、L-イソロイシンメチルエステル塩酸塩、L-プロリンメチルエステル塩酸塩及び L-フェニルアラニンメチルエステル塩酸塩から得た。

例9: この例においてフィルムは求核剤として単純な一級

アミン (アニリン) を用いて製造した。

HA (H<sub>2</sub>O 40ml 中400mg) の溶液を0.1NHClでpH4.7にした。次いでEDC (314mg; 1.6mmol) をすべて一度に加え、しかる後1mmolのアニリンを加えた。反応混合液をペトリ皿に注ぎ、乾燥させ、不溶性フィルムを得た。

例10: この例においてフィルムはロイシンの他のエステルを用いて製造した。

HA (H<sub>2</sub>O 40ml 中400mg) の溶液を0.1NHClでpH4.7にした。次いでEDC (314mg; 1.6mmol) をすべて一度に加え、しかる後1mmolのロイシンエステルを加えた。反応混合液をペトリ皿に注ぎ、乾燥させた。不溶性フィルムはL-ロイシンエチルエステル塩酸塩及びL-ロイシン- $\gamma$ -ブチルエステル塩酸塩の双方から得た。

例11: この例においてゲルは他のアミノ酸メチルエステルを用いて製造した。

HA (H<sub>2</sub>O 15ml 中400mg) の溶液をpH4.7にし、EDC (314mg; 1.6mmol) しかる後アミノ酸誘導体 (1mmol) を加えた。反応混合液は5~24時間以内で濃厚なゲルを形成した。非水溶性ゲルはL-バリンメチルエステル塩酸塩、L-イソロイシンメチルエステル塩酸塩、L-アルギニンメチルエステル塩酸塩、L-プロリンメチルエステル塩酸塩及びL-ヒスチジンメチルエステル塩酸塩を用いて得た。

例12: この例においてフィルムは求核剤としてアミノ酸アミド (ロイシンアミド) を用いて製造した。

HA (H<sub>2</sub>O 41ml 中400mg) の溶液を0.1NHClでpH4.7にした。次いでEDC (314mg; 1.6mmol) をすべて一度に加え、しかる後1mmolのL-ロイシンアミド塩酸塩を加えた。反応混合液をペトリ皿に注ぎ、乾燥させ、不溶性フィルムを得た。

例13: この例においてゲルはロイシンエチルエステル塩酸塩を用いて製造した。

HA (H<sub>2</sub>O 15ml 中400mg) の溶液をpH4.7にし、EDC (314mg; 1.6mmol) しかる後ロイシンエチルエステル塩酸塩 (1.0mmol) を加えた。混合液は5~24時間以内で濃厚な非水溶性ゲルを形成した。

例14: この例においてフィルム及びゲルはHA活性化剤としてETCを用いて製造した。

$1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$  ドルトン範囲の分子量を有するヒアルロン酸ナトリウム (400mg; 1.0mmol のカルボキシル基) を水 (10ml 及び30ml) に溶解した。各水溶液のpHを0.1N HClの添加でpH4.75に調整した。次いでETC 475mg (1.6mmol) をすべて一度に加え、しかる後L-ロイシンメチルエステル塩酸塩190mg (1.05mmol) を加えた。この反応混合液のpHは次の2時間でpH6.2まで上昇した。水10ml含有反応混合液は不溶性ゲルを形成した。水30ml含有反応混合液は乾燥後に不溶性フィルムを与えた。

例15: この例は着色フィルムの製造について示す。

HA (H<sub>2</sub>O 30ml 中400mg) の溶液を例13のようにpH4.75

にし、しかる後ETC (475mg; 1.6mmol) 及びロイシンメチルエステル塩酸塩 (190mg; 1.05mmol) を加えた。次いでH<sub>2</sub>O (0.5ml) 中“サーバブルー” (5mg/ml) の希溶液を反応混合液に加えた。得られた混合液をペトリ皿に注ぎ、非水溶性青色フィルムを16時間後に得た。青色はフィルムを1M NaClしかる後H<sub>2</sub>Oで洗浄したときにフィルムに留まった。

例16: この例は化学的改質HAのフィルムの組織生物適合性について示す。

例4で記載された操作に従い製造された4枚のフィルムと2枚のUSPネガティブコントロール片を白色ニュージラントウサギ (2匹/試験) の脊椎傍筋肉中に外科的に埋込んだ。試験部位は72時間後に肉眼的に又は7日間後に完全組織病理学的にいずれかで評価した。USP XX I, p. 1237によれば、試験物質はプラスチック物質の評価に関するUSP埋込試験の要求を満たした。

例17: この例はリジン改質HAの製造について示す。

水中HAの0.4% (w/w) 溶液を調製した。この溶液のpHを酸の添加で4.3~4.75に調整した。この溶液各100mlにEDCが完全に溶解するまで攪拌しながらEDC 0.76gを加えた。HA/EDC溶液各100mlにLMEが完全に溶解するまで攪拌しながらリジンメチルエステル (LME) 0.20gを加えた。HA、EDC及びLMEの添加は室温で行った; 最終HA/EDC/LME溶液が形成されたら、それを必要時まで4℃で貯蔵した。

LME改質HA物質は最終適用例に応じて様々な形状、サイズ及び粘稠度に加工処理できる。薄いシートの物質が望まれるならば、混合液は平坦な表面上に注ぐことができる。次いでこの物質は環境又は高温下で水を蒸発させることにより固体に変えることができる。その物質のシートの代替生産法はそれを凍結乾燥に付すことである。最終製品の孔径は初期凍結温度を調整することでコントロールできる。湾曲表面及び他の形状は最初にゲルを反対像表面上に流延し、しかる後前記のように加工処理することで同様に生産できる。乾燥シートは所望であればカーバー (Carver) 実験室用プレスで規定厚まで圧縮することにより更に加工処理できる。これはスペースが限られた解剖学的構造間に薄いフィルムをいれることを要する適用例で特に有用である。

標準塩水で再水和された凍結乾燥物質の機械試験では170~900g/cm<sup>2</sup>の破断値であった。この物質に関する破断値までの伸び率は33~62%であった。

例18: この例はCMC改質HAの製造について示す。

HA (0.4%w/w, 0.01M) と250,000の分子量及び0.65~0.90範囲の置換度を有するアクアロン (Aqualon) タイプCMC (0.19%w/w, 0.01M) を水溶液中室温で一緒にミックスした。混合液のpHを1M HClの添加でpH4.7~4.8に調整して維持した。この溶液各100mlにEDC 6.67g (0.04M) を加えた。EDCとの反応中に溶液のpHを0.1M HClの添加でpH4.7~4.8に維持し、反応を1時間進行させたと

ころ、その時間中に沈澱物が生じた。未反応EDCを酸性水 (pH4.0) に対する24時間の透析で沈澱物から除去したが、3及び19時間目に2回透析物交換した。次いでHA/CMCスラリーを平型中に流延し、室温で24時間風乾させた。

HA/CMC膜は実験動物モデルにおいて術後癒着形成の発生率を減少させることが示された。ラット盲腸剥離モデルを用いた実験において、HA/CMA膜を外科剥離ラット盲腸周辺において；以前の研究では癒着が制御的に剥離されたラットの盲腸で容易に生じることを実証した。HA/CMC膜又はORC膜（癒着防止用にジョンソン&ジョンソン (Johnson & Johnson) 市販のインターシード (Intercord) TC7膜）のいずれかを受容した動物群における盲腸癒着を盲腸が剥離されたが但しいかなる膜も受容していない動物における癒着コントロールと比較した。これら実験の結果はHA/CMC膜がコントロール動物及びインターシードTC7フィルムを受容した動物と比較して一貫して癒着形成を減少させることを示した。

例19: この例はEDC活性化HAの製造について示す。

HA ( $1.0 \times 10^6$  ドルトン) を25℃で一夜攪拌することにより水に溶解させた0.8%w/v溶液を得た。反応混合液のpHを0.1N HClでpH4.75に調整した。EDC (4:1モルのEDC対HA、最終濃度1.53w/v) を連続攪拌下でこの溶液に加え、0.1N HClの追加で1時間にわたり一定pH (4.7~5.1) で維持した。未反応EDC及び他の低分子量不純物の除去は標準方法を用いて分子量サイジング、透析又は透析濾過のいずれかで行った。非水溶性の透明なゲルをこのプロセスの後に得た。

例20: この例は水溶性溶媒によるEDC活性化HAの分別沈澱の効果について示す。

例19で記載された操作を繰り返したが、但し未反応EDC及び他の低分子量不純物は適切な水溶性溶媒 (例えば、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-アルコール、アセトン) を用いて分別沈澱により除去した。これらの条件下で非水溶性繊維を生産した。

例21: この例はEDC活性化CMCの製造について示す。

CMC ( $250 \times 10^3$  ドルトン) を室内環境温度 (22~25℃) で一夜攪拌することにより水に溶解させて0.8%w/v溶液を得た。反応混合液のpHを0.1N HClでpH4.75に調整した。EDC (4:1モル比のEDC対CMC、最終濃度1.53w/v) を連続攪拌下でこの溶液に加え、pHを0.1N HClの追加で1時間にわたり4.70~5.10に維持した。未反応EDC及び他の低分子量不純物の除去は分子量サイジングクロマトグラフィー、透析、透析濾過又は適切な水溶性溶媒 (例えば、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-アルコール、アセトン) によるCMCの分別沈澱のいずれかで行った。約300~800  $\mu$ m長及び10~20  $\mu$ m幅の非水溶性繊維がこれらの反応条件から生産される。

例22: この例はEDC活性化HAとEDC活性化CMCとのブレンドの製造について示す。

EDC活性化HA及びCMCを例19及び21で記載されたように別々に製造したが、但し各反応生成物はブレンド前に精製しなかった。活性化HA300ml及び活性化CMC300mlを1000mlビーカーにいれ、ツラックス (Turrax) ブランドブレンダーにより6000rpm、25℃で10分間ブレンドした。この得られた混合液を3回の透析物交換により20:1比で24時間にわたりpH4.0水に対する透析で精製した。透析後に混合液を平型に注ぎ、薄い非水溶性フィルムになるまで風乾させた。混合物中における繊維の量は一緒にブレンドされる活性化CMC及び活性化HAの相対量を変えることによりコントロールできる。

例23: この例はHOBt及びEDCを用いたHAとヒスチジンとのカップリングについて示す。

水 (40ml) 中ヒアルロン酸ナトリウム (200mg、0.5mmol、MW1,700,000) 及び1-ヒスチジン (155.2mg、1.0mmol) の溶液に1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (HOBt) (67.6mg、0.5mmol) を加え、しかる後1N HClでpHを3.35に調整した。1時間の攪拌後に1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC) (154.4mg、0.8mmol) を加え、pHを1N HClの添加で2時間にわたり4.0~4.8に維持した。飽和炭酸ナトリウムを加えてpHを7.01に調整し、生成物を95%エタノール (約150ml) の添加により沈澱させた。得られた固体物を真空濾過で集め、無水エタノール (3×20ml) で洗浄し、凍結乾燥により乾燥させた。改質ポリマーの全収率は65%であった。その物質は更に精製せずに直接用いた。

例24: この例はHOBt及びEDCを用いたHAと3-ジメチルアミノプロピルアミンとのカップリングについて示す。

水 (3ml) 中3-ジメチルアミノプロピルアミン (102mg、1.0mmol) を1N HClでpH7.0に調整し、水 (40ml) 中ヒアルロン酸ナトリウム (200mg、0.5mmol、MW1,700,000) の溶液に加えた。1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (HOBt) (67.6mg、0.5mmol) を加え、pHを1N HClで3.35に調整した。1時間の攪拌後に1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC) (154.4mg、0.8mmol) を加え、pHを1N HCl及び/又は10%w/v炭酸ナトリウムの添加で50分間にわたり4.6に維持した。次いで飽和炭酸ナトリウムを加えてpHを7.0に調整し、生成物の半分を下記のような限外濾過又はエタノール沈澱法のいずれかにより精製した。

一部 (20ml) の反応溶液を水で3回の容量交換に対して環境温度で限外濾過 (1000MWCO) により精製した。保留液を約12mlに濃縮し、更に精製せずに用いた。

更に一部 (20ml) の反応溶液を10%w/v水性NaCl (5ml) に加え、しかる後95%エタノール (約75ml) を加えた。これにより沈澱を形成させ、それを真空濾過により集め、無水エタノール (3×20ml) で洗浄し、凍結乾燥により乾燥させた。生成物は更に精製せずにヒドロゲル

を製造するために直接用いた。

例25: この例はHOBt及びEDCを用いたHAとジヒドロキシフェニルアミン（ジ-DOPA）とのカップリングについて示す。

水（40ml）中ヒアルロン酸ナトリウム（200mg、0.5mmol、MW2,100,000）及びd,l-DOPA（200mg、1.0mmol）の溶液に1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物（HOBt）（67.6mg、0.5mmol）を加え、しかる後1N HClでpHを4.35に調整した。1時間の攪拌後に1-（3-ジメチルアミノプロピル）-3-エチルカルボジイミド塩酸塩（EDC）（154.4mg、0.8mmol）を加え、pHを1N HCl又は10%w/v水性炭酸ナトリウムいずれかの適切な添加で2時間にわたり4.0〜4.8に維持した。飽和炭酸ナトリウムを加えてpHを7.0に調整し、生成物を95%エタノール（ $\approx$ 150ml）の添加により沈澱させた。得られた固体物を真空濾過で集め、無水エタノール（3 $\times$ 20ml）で洗浄し、凍結乾燥により乾燥させた。その物質は更に精製せずにヒドロゲルを製造するために直接用いた。酸化から物質を保護するために空気とのゲル接触を制限させる注意が払われるべきである。

例26: この例はHOBt及びEDCを用いたCMCと3-ジメチルアミノプロピルアミンとのカップリングについて示す。

水（3ml）中3-ジメチルアミノプロピルアミン（102mg、1.0mmol）を1N HClでpH7.0に調整し、水（20ml）中CMC（125mg、0.5mmol、MW250,000）の溶液に加えた。1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物（HOBt）（67.6mg、0.5mmol）を加え、pHを1N HClで4.0に調整した。1時間の攪拌後に1-（3-ジメチルアミノプロピル）-3-エチルカルボジイミド塩酸塩（EDC）（154.4mg、0.8mmol）を加え、pHを1N HCl及び／又は10%炭酸ナトリウムの添加で1時間にわたり4.7に維持した。反応の最後に10%炭酸ナトリウムを加えてpHを7.0に調整した。生成物はエタノール沈澱後に白色固体物として得た。

例27: この例はBop活性化HAとグリシンメチルエステルとのカップリングについて示す。

水（40ml）中ヒアルロン酸ナトリウム（200mg、0.5mmol、MW2,100,000）の溶液にジメチルホルムアミド（1ml）中ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（Bop）（442.3mg、1.0mmol）を加え、しかる後pHを1N HClで4.6に調整した。15分間の攪拌後にグリシンメチルエステル塩酸塩（126mg、1.0mmol）を加え、反応混合液を環境温度で40時間攪拌した。反応混合液を分液漏斗に移し、塩化メチレン（3 $\times$ 50ml）で抽出した。水層を除去し、生成物を95%エタノールで沈澱させ、真空濾過により集めた。固体物を少量の無水エタノールで洗浄し、風乾させた。この物質は更に精製せずに直接ヒドロゲルを製造するために用いた。

例28: この例はBop活性化HAと3-アミノ-1-プロパノールとのカップリングについて示す。

ールとのカップリングについて示す。

水（20ml）中ヒアルロン酸ナトリウム（200mg、0.5mmol、MW1,700,000）の溶液にベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（442.3mg、1.0mmol）を加えた。15分間後に3-アミノ-1-プロパノール（45.1mg、0.6mmol）をジメチルホルムアミド（3ml）と共に加え、反応混合液のpHを1.0N HClで4.8に調整した。環境温度で一晩攪拌後にこの反応混合液のpHを飽和炭酸ナトリウムで $\approx$ 7.0に調整し、反応混合液を塩化メチレン（3 $\times$ 50ml）で抽出した。水相を分離し、95%エタノール（ $\approx$ 100ml）を加えて生成物を沈澱させた。固体物を真空濾過により集め、無水エタノール（3 $\times$ 20ml）で洗浄し、減圧下収率60%で乾燥させた。その物質は更に精製せずにヒドロゲルを製造するために直接用いた。

例29: この例は例23〜28の反応生成物を用いたヒドロゲルの形成について示す。

例23〜28のいずれかの反応生成物の固体部分（20mg）を0.9%w/v塩化ナトリウム溶液（20ml）に加え、混合液を環境温度で一晩放置した。この時間経過後に透明無色のヒドロゲルが生じたが、これは残留塩化ナトリウム溶液をデカントすることで単離した。次いでこれらの得られたゲルは物理的及びインビトロ評価のために直接用いた。

例30: この例はHOBt及びEDCを用いたHA及びCMCと3-ジメチルアミノプロピルアミンとのカップリングについて示す。

水（500ml）中ヒアルロン酸ナトリウム（4.0g、10mmol、MW2,300,000）及びカルボキシメチルセルロース（5.1g、20mmol、MW250,000）の溶液に1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物（4.1g、30mmol）及び3-ジメチルアミノプロピルアミン塩酸塩（4.2g、30mmol）を加え、pHを1N HClで4.60に調整した。すべての化合物が溶解した後で1-（3-ジメチルアミノプロピル）-3-エチルカルボジイミド塩酸塩（8.0g、40mmol）を加え、pHを1N HCl又は10%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>いずれかの添加で1時間にわたり4.6〜5.0に維持した。次いでpHを10%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で5.0に調整し、溶液の半分を4倍反応液容量のエタノールでエタノール沈澱させ、更にエタノールで洗浄し、風乾した。残り半分はpH4.75に調整された水（20倍容量）に対して24時間透析した（12,000NMWカットオフ透析管）。

#### 用途

本発明のフィルム、フォーム又はゲルは、例えばDeBelderらのPCT公開第W0 86/00912号明細書に記載されたように、外科業界で知られる操作に従い術後又は治療期間中に体組織の癒着又は付着を妨げるために外科補助品として使用できる。手術中に1枚以上のゲル又はフィルムが分離させたままにしておく組織の間又は中に適宜に挿入又は注入される。

本発明のフィルム、フォーム又はゲルは更に徐放薬物デリバリーに用いることもできる。デリバリーされる薬

物は例えばT. J. Rosemanら, Controlled Release Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New YorkにおいてR. V. Sparerら, 1983, Chapter 6, pages 107-119で記載されたようにゲル又はフィルムに共有結合させることができる; 次いでゲル又はフィルムはデリバリーが望まれる箇所で埋込み又は注入できる。

他の態様は下記請求の範囲内に属する。例えば、反応の規模は本発明の組成物の商業生産のために増加させてもよい。ポリアニオン性多糖対活性化剤の比率変更がポリアニオン性多糖の官能度をコントロールすることも当業者であればよく理解される。

フロントページの続き

(72) 発明者- ズウ、ズウエイアン  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州、ケンブリッジ、レインジ、アベニュー、7エム、402

(56) 参考文献 特開 昭58-170720 (J P, A)  
特表 昭55-500785 (J P, A)  
米国特許4937270 (U S, A)

(58) 調査した分野 (Int. Cl. 7, D B 名)

C08B	37/00
A61K	47/36
CA	(STN)